

2290

血液脳関門の加齢変化と薬物の中枢移行性

(課題番号 10672142)

平成 10 年度～平成 11 年度科学研究費補助金(基盤研究 C)

研究成果報告書

平成 12 年 3 月

研究代表者 松原和夫

(旭川医科大学医学部教授)

血液脳関門の加齢変化と薬物の中枢移行性
(課題番号 10672142)

平成 10-11 年度科学研究費補助金 (基盤研究 C)
研究成果報告書

平成 12 年 3 月

研究代表者 松 原 和 夫
(旭川医科大学医学部教授)

(1) はしがき

最近の薬物は薬理活性の強い、いわゆる切れの良い化合物が開発され、個個人に適した薬物投与設計が望まれている。その中でも、生体諸機能は加齢に従って変化するために、乳幼児及び高齢者における薬物投与設計には特に注意が必要である。肝血流量・腎機能・血中アルブミン量などの末梢機能の加齢変化については、優れた報告が多くあり実際の薬物投与設計に役立てられている。しかし、血液脳関門の加齢による変化についての研究は少なく、加齢による薬物の脳内移行性に関する情報は乏しい。高齢化社会を迎え高齢者の薬剤使用量が激増する中、適切な薬物投与設計による高齢者のQOLの向上のために、薬物の中枢移行性に関する系統だった研究が必要とされている。

本研究では、薬物の血液脳関門透過性をブレインマイクロダイアリシス法によって評価する系を確立し、血液脳関門の加齢変化が薬物の中枢移行性にどのように影響を及ぼすかを研究する。これによって、適切な薬物投与設計を行う上での基礎的な情報を得ることを目的とする。血液脳関門透過性において、能動輸送型及び単純拡散型の化合物では、加齢による移行性の変化は異なることが予想され、それぞれのモデルにおいての情報を得ることが必要である。

(2) 研究組織

平成 10 年度

研究代表者：松原和夫（旭川医科大学・医学部・教授）

研究分担者：上園 崇（島根医科大学・医学部・助手）

平成 11 年度

研究代表者：松原和夫（旭川医科大学・医学部・教授）

研究分担者：清水恵子（旭川医科大学・医学部・助手）

上園 崇（旭川医科大学・医学部・助手）

(3) 研究経費

平成 10 年度 2,100 千円

平成 11 年度 1,100 千円

合計 3,200 千円

(4) 研究発表

[学会誌等]

- (1) K. Matsubara, T. Gonda, H. Sawada, T. Uezono, Y. Kobayashi, T. Kawamura, K. Ohtaki, K. Kimura, A. Akaike
Endogenously Occurring β -Carboline Induces Parkinsonism in Non-Primate Animals: a Possible Causative Pro-Toxin in Idiopathic Parkinson's Disease.
Journal of Neurochemistry 70: 727-735, 1998.

[口頭発表]

- (1) 大滝康一、栗屋敏雄、小川 聡、里見真知子、早勢伸正、松原和夫、清水恵子、上園 崇、塩野 寛
パラコートはアミノ酸輸送系によって血液脳関門を透過する—ブレインマイクログリアリシス法による検討
日本薬学会第 119 年会、平成 11 年 4 月、徳島
- (2) 清水恵子、上園 崇、水上 創、塩野 寛、大滝康一、早勢伸正、松原和夫
パラコートはアミノ酸能動輸送系を介して血液脳関門を透過する
日本法中毒学会第 18 年会、平成 11 年 6 月、福岡
- (3) K. Shimizu, K. Ohtaki, K. Matsubara, T. Uezono, N. Hayase, H. Mizukami, Y. Saito, and H. Shiono
NEUTRAL AMINO ACID TRANSPORTER MEDIATES BLOOD-BRAIN BARRIER PENETRATION OF PARAQUAT BUT NOT MPP+.
28th annual Meeting of Society for Neuroscience, November, 1999, Maimi (U.S.A.)
- (4) 大滝康一、清水恵子、山下恭範、小川 聡、上園 崇、栗屋敏雄、里見真知子、千葉 薫、早勢伸正、塩野 寛、松原和夫
セフォセリス(ウィンセフ)の血液脳関門透過性—腎不全ラットにおける検討
日本薬学会第 120 年会、平成 12 年 3 月、岐阜
- (5) Keiko Shimizu, Ko-ichi Ohtaki, Takashi Uezono, Nobumasa Hayase, Hajime Mizukami, Kazuo Matsubara and Hiroshi Shiono
Paraquat penetrates BBB by neutral amino acid transporter and increases extracellular glutamate level.
第 73 回日本薬理学会年会、平成 12 年 3 月、横浜

研究成果の概要

1. 内因性神経毒によるパーキンソニズムとその血液脳関門透過性に関する研究
2. パラコートの血液脳関門透過性とその輸送系に関する研究
3. ベータラクタム系抗生物質ウィンセフの血液脳関門透過性と腎障害の影響に関する研究

2. パラコートの血液脳関門透過性とその能動輸送系に関する研究

**Neutral Amino Acid Transporter Mediates Blood
Brain-Barrier Penetration of Paraquat but not MPP⁺ by
Microdialysis Study**

K. Shimizu ^a, K. Ohtaki ^b, K. Matsubara ^{b,*}, S. Ogawa ^b,
T. Awaya ^b, O. Saito ^a, N. Hayase ^b and H. Shiono ^a

Departments of ^aLegal Medicine and ^bHospital Pharmacy & Pharmacology,
Asahikawa Medical College, Asahikawa 078-8510

Introduction

According to epidemiological studies, environmental factors may contribute to the etiology of Parkinson's disease. Although controversial, paraquat is a possible pesticide to induce Parkinson's disease, since a strong correlation has been found between the incidence of the disease and the amount of paraquat used. Because of its structural similarity to MPP⁺, paraquat might induce dopaminergic toxicity in the brain. However, its BBB penetration has not been well documented. In this study, we examined the manner in the BBB penetration of paraquat using a brain microdialysis technique in rats. After subcutaneous administration, paraquat appeared dose-dependently in the dialysate. On the contrary, MPP⁺ could not penetrate the BBB in either control or paraquat pre-treated rats. This indicated that the penetration of paraquat into the brain would be mediated by a certain carrier process, but not resulted from the destruction of the BBB. To test if paraquat was carried through the BBB on the a certain amino acid transporter, valine or lysine was pre-treated. We found that valine strikingly reduced the BBB penetration of paraquat and elevated blood levels. Valine is a high affinity substrate for neutral amino acid transporter, which mediates the transport of several neutral amino acids in a Na⁺-independent manner. Thus paraquat is possibly taken up into the brain by the neutral amino acid transport system. However, it is not certain whether the exposure to paraquat for a long period induces parkinsonian symptoms.

□ Paraquat is a widely used, non-selective herbicide. Unfortunately, this herbicide is toxic and is often lethal to animals, including man. The major lesion caused by paraquat is seen in the lung, and it has been proposed that this is due, at least in part, to an energy dependent accumulation of the herbicide in this organ. The herbicide paraquat, bearing structural similarity to the known dopaminergic neurotoxicant 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), has been suggested as a potential etiologic factor in Parkinson's disease. According to epidemiological studies, environmental factors may contribute to the etiology of Parkinson's disease. Although controversial, paraquat is a possible pesticide to induce Parkinson's disease, since a strong correlation has been found between the incidence of the disease and the amount of

paraquat used. Because of its structural similarity to N-methyl-4-phenylpyridinium cation (MPP+), paraquat might induce dopaminergic toxicity in the brain. Indeed, paraquat administered systematically to experimental animals induces behavioral and biochemical changes compatible with parkinsonian symptoms, such as increase in rigidity, akinesia, tremor, decrease in dopamine concentration and increase in pigmentation.

However, its blood-brain barrier (BBB) penetration has not been well documented. In this study, we examined the manner in the BBB penetration and neural uptake of paraquat using a brain microdialysis technique in rats.

Materials and Methods

Reagents

1. Animal treatments

Anesthetized (50 mg/kg i.p., sodium pentobarbital) male Wistar rats (250-300 g, SLC, Japan) were stereotaxically implanted with 22-gauge cannulae in the left striata at AP + 1.0 mm, L + 2.8-2.9 mm from the bregma, and - 3.5 mm from the skull, according to the stereotaxic atlas of Paxinos and Watson (1986). Dummy probes were then placed inside the cannulae. The rats were housed in plastic cages (30 x 30 x 35 cm) with free access to food and water, and more than 5-day recovery period was allotted. The animal experiments were done in accordance with the guidelines for care and use of laboratory animals by the Committees of Asahikawa Medical College.

2. BBB penetration

The microdialysis probes with dialysis area of 3 mm length were of the I-shaped type prepared according to the method of Nakahara et al.(1994). After inserting through the guide cannula, the probe was connected to a microinfusion pump and perfused with Ringer's solution (146 mM Na⁺, 1.26 mM Ca²⁺, 4 mM K⁺, 1.0 mM Mg²⁺ and 154.5 mM Cl⁻) at a flow rate of 2 μ l/min.

After 4 h pre-perfusion with Ringer's solution to recover brain injury, the dialysate was collected for 60-min. Then, paraquat (5, 10 and 20 mg/kg) was administered subcutaneously on the back of the neck. Subsequently, the dialysate collection with a 60-min interval was performed for 180 min. To test the suitability of the brain dialysis technique, the BBB-penetration of MPP⁺ (10 mg/kg, subcutaneously) was also examined. Paraquat and MPP⁺ in the dialysate were directly injected into a HPLC apparatus.

At the end of the perfusion, the rat was deeply anesthetized with pentobarbital, and the blood was collected from the heart. The blood was deprotonized with 4 volumes of 0.5 N perchloric acid and then centrifuged at 12000 g for 10 min. Paraquat in the supernatant was analyzed by the HPLC.

3. BBB damage by paraquat

It was considered that paraquat might enter into the brain by the direct injury to the BBB. To check this, MPP⁺ was administered 1 h after a paraquat injection, then MPP⁺ in the dialysate was analyzed.

4. Amino acid transporter

To test if paraquat was carried into the brain through a certain amino acid transporter, valine or lysine (200 mg/kg each) was intraperitoneally pre-administered 30 min prior to the paraquat injection. Paraquat in the dialysate was determined as described above.

5. Uptake into cells

The concentration of paraquat in the striatum was measured after 60-min perfusions with a 20 mg/l solution of the compound followed by a 180-min washout with Ringer's solution. The animal was decapitated, and ipsi- and contra-lateral striatums were removed immediately. The tissue was sonicated in 0.5 ml of 0.2 N perchloric acid, and then centrifuged at 12000 g for 15 min. Paraquat in the supernatant was purified with Sep-pack C18 cartridge and then measured by the HPLC.

結果と考察

1. パラコートと MPP+に対するダイアリシスプローブの透過性を検討したところ、Table 1 の結果を得た。これらの値をもとに、脳細胞外液の薬物濃度を計算した。

2. 灌流液から明瞭にパラコートを検出し、パラコートは血液脳関門を通過することが判明した (Fig. 1)。また、パラコートの脳血液関門を通過は、容量依存的であった (Fig. 2)。

3. 一方、MPP+を投与したラットの灌流液からは、MPP+は検出されなかった (Fig. 3)。この MPP+の非透過性は、マイクロダイアリシス法による薬物の血液脳関門透過性の研究が妥当な手段であることを示した。

4. パラコートの血液脳関門透過性は、パラコートラジカルによって直接血液脳関門に障害を与えバリアー機構を低下させる可能性も考えられる。そうであれば、パラコートを投与後、MPP+を投与すれば MPP+が灌流液中に見いだされるはずである。しかし、Fig. 3 のようにパラコート前処置の MPP+投与ラット脳灌流液からも、MPP+は検出されなかった。従って、パラコートの脳血液関門透過は、パラコート (パラコートラジカルなどによる酸化的障害) による血液脳関門の器質的障害に基づくものではなく、能動輸送系を介するものと考えられる。

5. バリンは中性型アミノ酸輸送系の基質であり、リジンはカチオン型アミノ酸輸送系の基質である。これらを大量に前投与しておけば、一時的にこれらに関する輸送系は飽和されることになる。バリン及びリジンの前処置で、バリンによってのみ有意にパラコートの血液脳関門透過が阻害された (Table 2)。このことは、中性型アミノ酸輸送系の関与がパラコートの血液脳関門透過に関与していることが示唆された。

6. しかし、脳細胞外液/血液は低く、消失も早かった (Figs. 2 & 5)。20 mg/kg 投与時の脳細胞外液からの消失速度定数は -0.89 h^{-1} 、半減期は 0.8 h であった。

7. パラコートを灌流液を通して直接線条体に投与したラット線条体を分析した。Fig. 6 に示すように、投与した片側の線条体より明瞭にパラコートを検出した。その量は、Table 3 に示す通りであった。このことは、パラコートが血液脳関門を通過した後、脳細胞実質に取り込まれることを示す。この脳細胞への取り込みに関する輸送系は、不明である。

8. パラコートの急性毒性の標的臓器は、肺である。今回の結果から、中枢系にもパラコートが移行することが確定した。しかし、長期間に渡る低濃度のパラコートが、中枢神経系に障害を引き起こすかどうかは明らかでない。

パラコートの取り込みに関与する能動輸送系には、1) 有機カチオン輸送系、2) ポリアミン輸送系、及び可能性として3) アミノ酸輸送系が考えられる。本研究では、多くの化合物をテストしていないが、中性アミノ酸輸送系の基質であるバリンによって、パラコートの BBB 通過が抑制された。しかし、カチオンアミノ酸輸送系の基質であるリジンによっては、パラコートの BBB 通過が抑制されなかった。パラコートと類似化学的構造の MPP+は、BBB を通過しない。

これらの事実と報告されているパラコートの輸送系 1 - 1) と 2) について考察してみる。

1) 有機カチオン輸送系

これには、モノカチオン選択的とポリカチオンにも活性をもつ2つのタイプがある。パラコートは後者に親和性を有する。一方、MPP+は、両者に親和性を持つ。従って、BBB にこれらの輸送系が関与するとすると、MPP+も脳内に検出されなくてはならなくなり、パラコートの BBB 通過には有機カチオン輸送系は関与していない。

2) ポリアミン輸送系

パラコートがポリアミン輸送系を介して細胞内に蓄積されるという報告は沢山存在するが、影響を与えないという報告もある。

ポリアミン輸送系には、スペルジン及びスペルミン輸送に関与するタイプ1とプトレスシンに関与するタイプ2の二つが存在すると言われている。パラコートは前者には、極めて弱い阻害作用しか示さない。しかし、プトレスシンの取り込みは強く阻害する。プトレスシンの輸送系は、オルニチン/リジンとの交換反応をともなうアンチポーターであり、リジンによって抑制される。リジンの投与によって本研究では、パラコートの BBB 通過は抑制されなかった。従って、プトレスシンの関与するポリアミン輸送系によってパラコートが BBB を通過するとは考えがたい。

以上のことを総合すると、パラコートの BBB 通過は、中性アミノ酸輸送系を介していると考えることができる。

アミノ酸は、ポリアミン輸送系の基質とはならないが、カチオン型アミノ酸がポリアミン生合成の前駆体となるので、ポリアミン輸送系を調整していると考えられている。従って、ポリアミン輸送系のパラコートの BBB 通過への関与を完全に否定するものではない。従って、4級アンモニウムと1級アミンのポリアミ

ンが Na⁺-dependent の輸送系（イオン交換）を共用できるであろうか。Tetraethylammonium は、4 級アンモニウムであり、有機カチオンの輸送系にのるが、ポリアミン輸送系とは関与しない。パラコートがポリアミン輸送系にのるといふのは再考する必要がある。

また、長期間の低濃度のパラコート暴露により、脳に障害が発生する可能性も示唆され、今後の更なる研究が必要である。

Table 1. The Recovery Efficiency of the Microdialysis Probe for Paraquat and MPP+.

	n	Recovery (%)
Paraquat	4	12.1 ± 1.4
MPP+	4	18.7 ± 2.6

The recovery efficiency of the probe was tested in 500 ng/ml of each drug solution. The data are expressed as means ± SEM.

Table 2. Effects of Pre-treatment of Valine and Lysine on Paraquat Blood-Brain Barrier Penetration.

	n	Extracellular level in the striatum			Serum	Ratio (2-3 h/serum)
		0-1 h	1-2 h	2-3 h		
Paraquat (control)	8	1.40 ± 0.33	0.63 ± 0.12	0.23 ± 0.04	2.50 ± 0.75	0.13 ± 0.03
Paraquat + valine	8	0.41 ± 0.09**	0.22 ± 0.04*, ¶	0.19 ± 0.07	3.63 ± 0.87	0.06 ± 0.01
Paraquat + lysine	8	1.08 ± 0.28	0.59 ± 0.08	0.26 ± 0.08	2.36 ± 0.54	0.18 ± 0.07

Valine or lysine (200 mg/kg each) was intraperitoneally administered 30 min before a subcutaneous paraquat (20 mg/kg) injection. Data are expressed as means ± SEM ($\mu\text{g}/\text{ml}$). Statistical analysis was performed using a two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures on one factor and one factorial ANOVA, followed by the post hoc Dunnett t-test. * $p < 0.01$ and ** $p < 0.05$ vs control rats, and ¶ $p < 0.01$ vs lysine-treated rats.

Table 3. the concentrations of paraquat in the ipsi- and contra-lateral striatum, after a 60-min perfusion with 50 μ M solution followed by 3-h washing with Ringer's solution.

	n	Ipsilateral	Contralateral
Paraquat (pmoles/striatum)	4	69.6 \pm 31.0	not detected

The data are expressed as means \pm SEM.

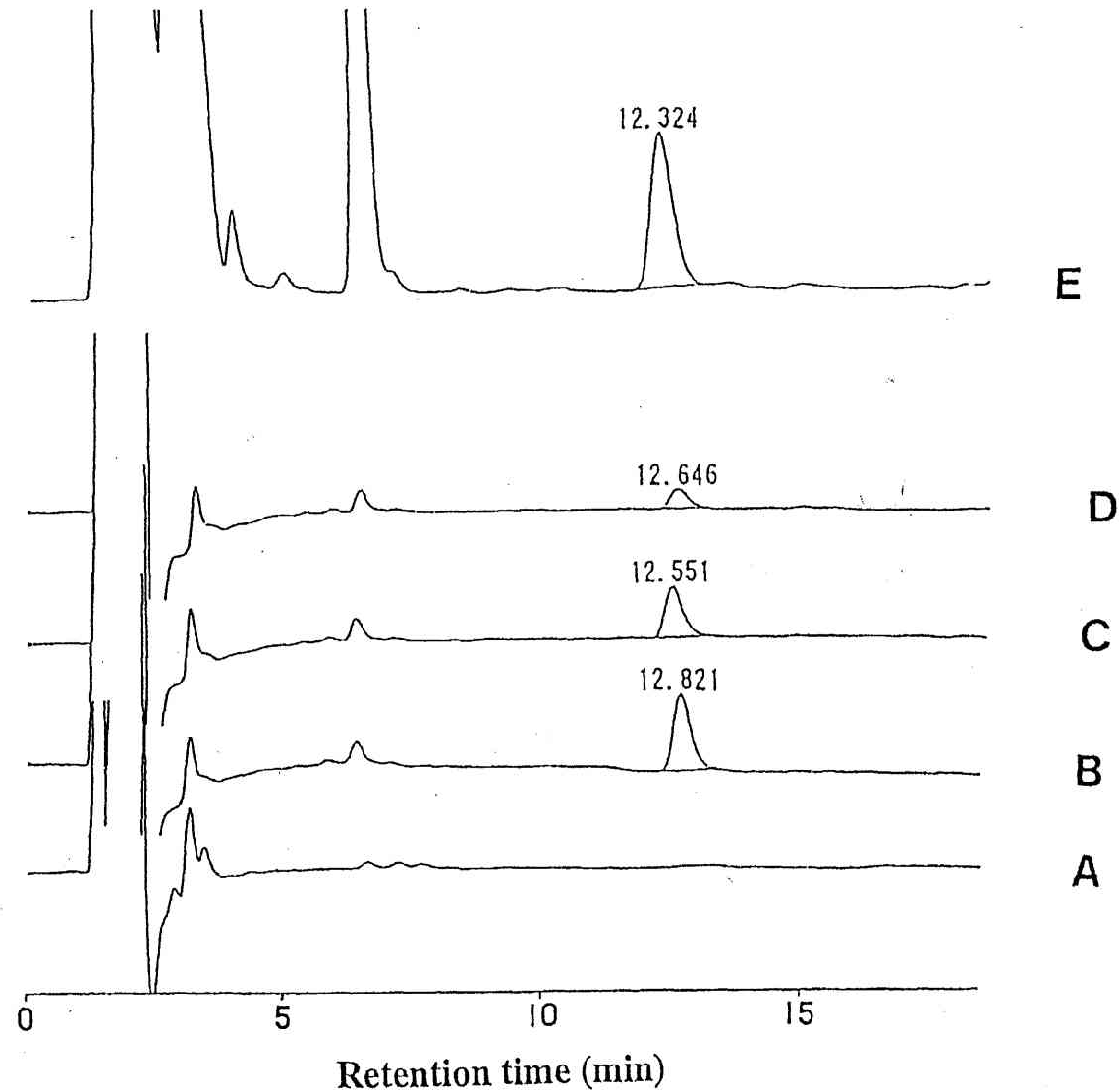


Fig. 1. Typical HPLC chromatograms (A-D) of the dialysate samples before and after a 20 mg/kg paraquat injection. A: before paraquat injection, B: 0-1 h, C: 1-2 h and D: 2-3 h after the administration. The chromatogram E was from the blood sample collected 3 h after the paraquat administration (20 mg/kg).

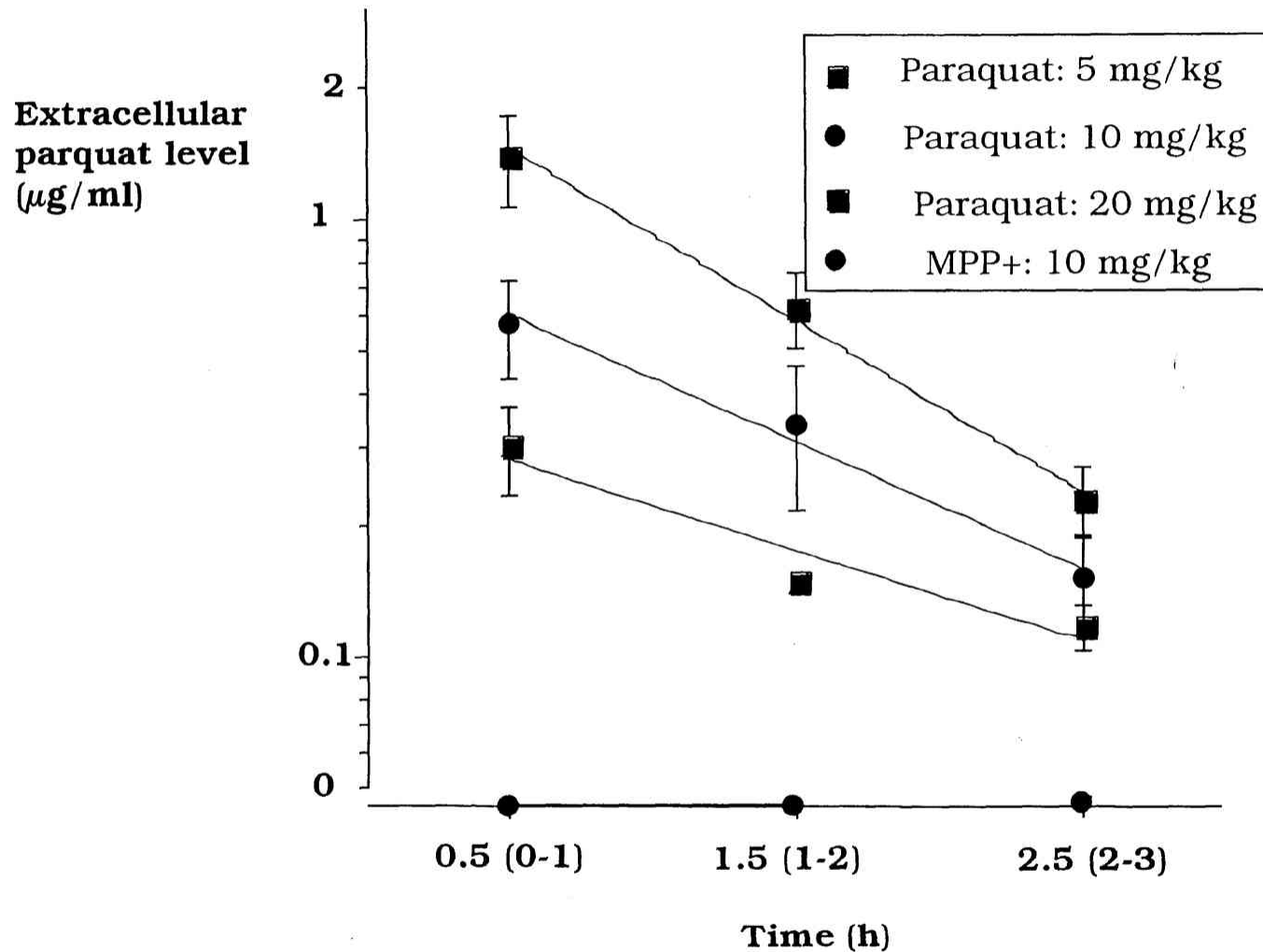


Fig. 2. Extracellular Concentrations of Paraquat and MPP+ in the Striatum after the Subcutaneous Injection.

Drug concentrations were corrected by the recovery of the dialysis probe. The recoveries for paraquat and MPP+ were 12.1 ± 1.4 and $18.7 \pm 2.6\%$, respectively.

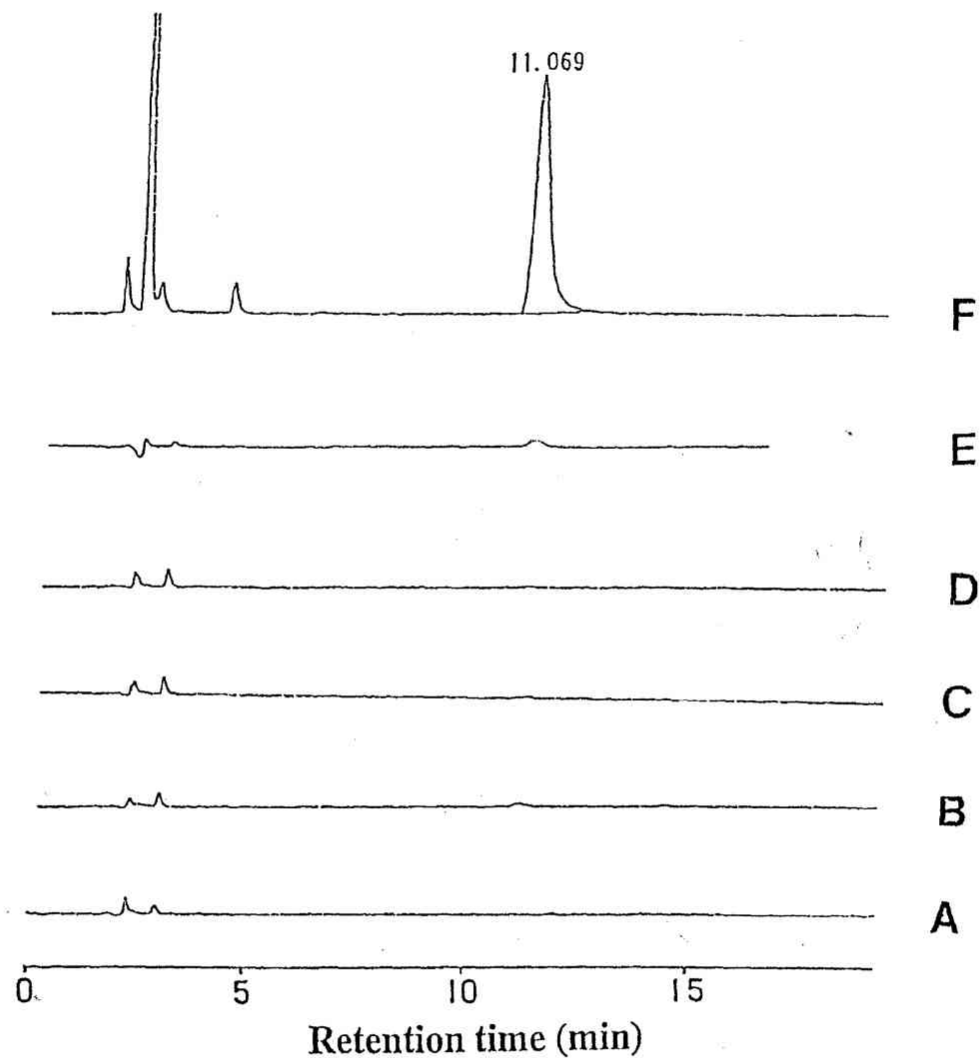


Fig. 3. Typical chromatograms (A-D) of the dialysate samples before and after a 10 mg/kg MPP⁺ injection. A: before paraquat injection, B: 0-1 h, C: 1-2 h and D: 2-3 h after the administration. Chromatogram E was from the dialysate sample 0-1 h after a MPP⁺ administration in the paraquat pre-administered rat. Chromatogram F was obtained from the blood sample collected 3 h after the MPP⁺ administration (10 mg/kg).

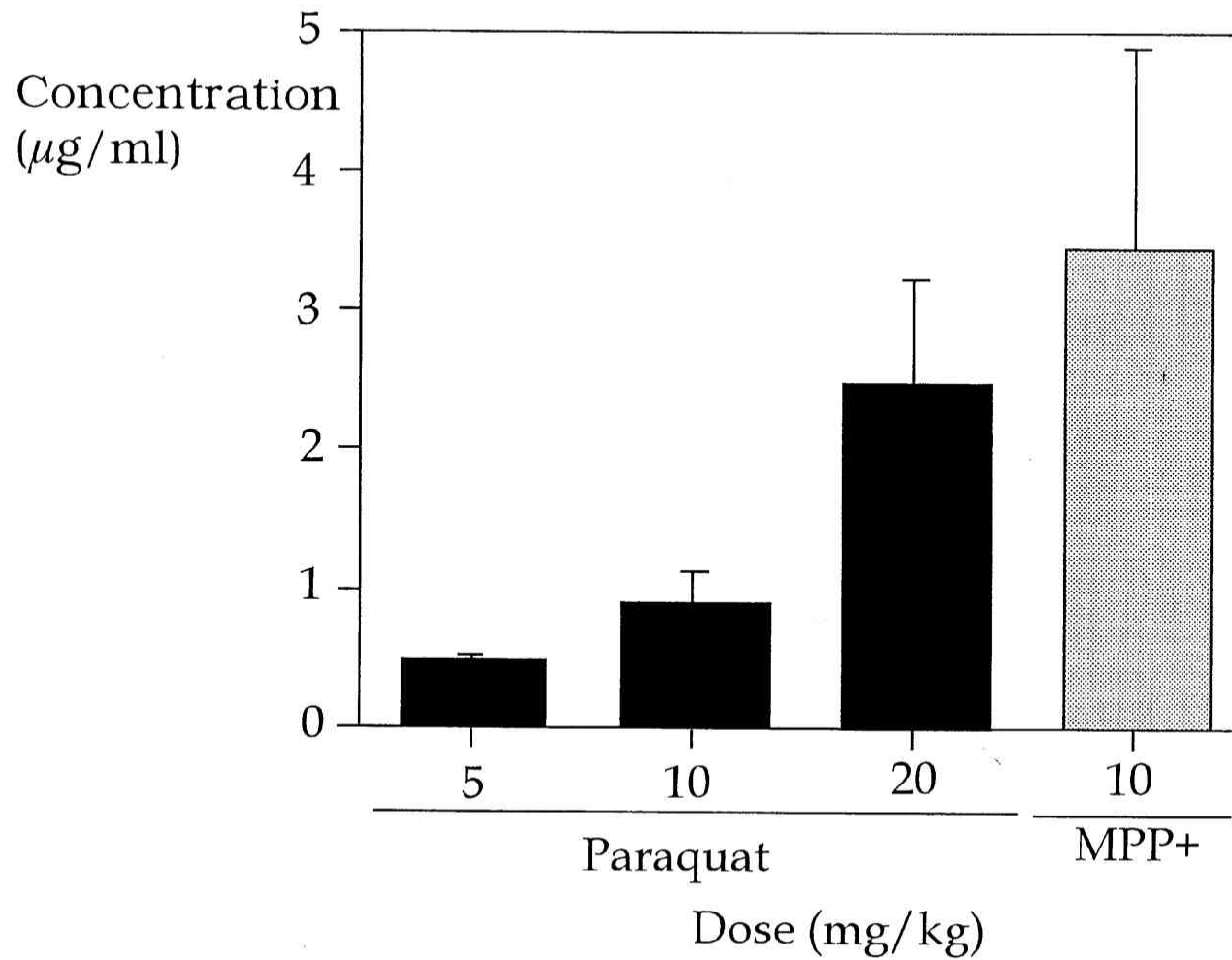


Fig. 4. Paraquat and MPP+ Concentrations in Blood 3 h after Administration.

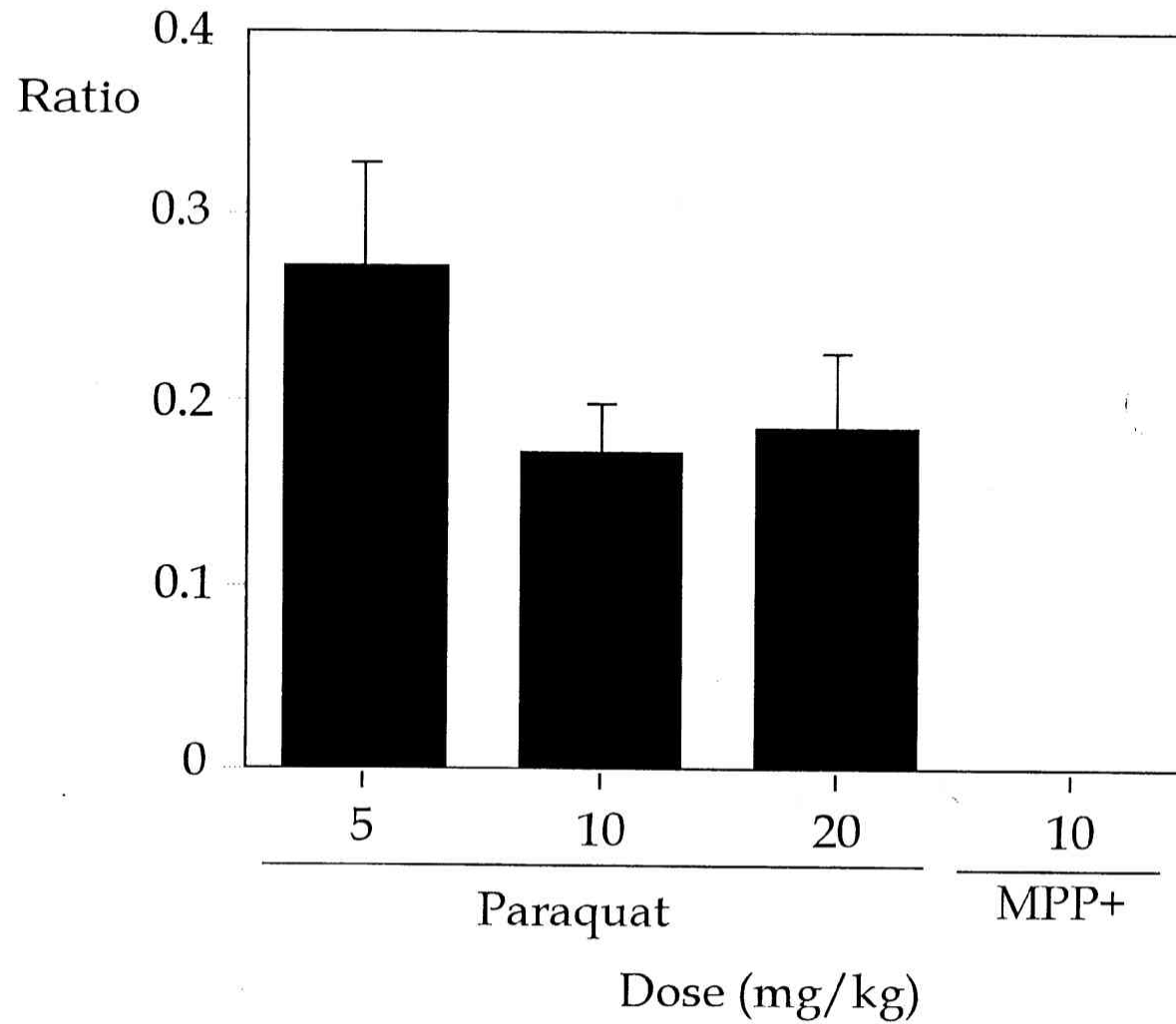


Fig. 5. The Ratios of Brain Extracellular to Blood Concentraions. Extracellular levels in 2-3 h samples were used.

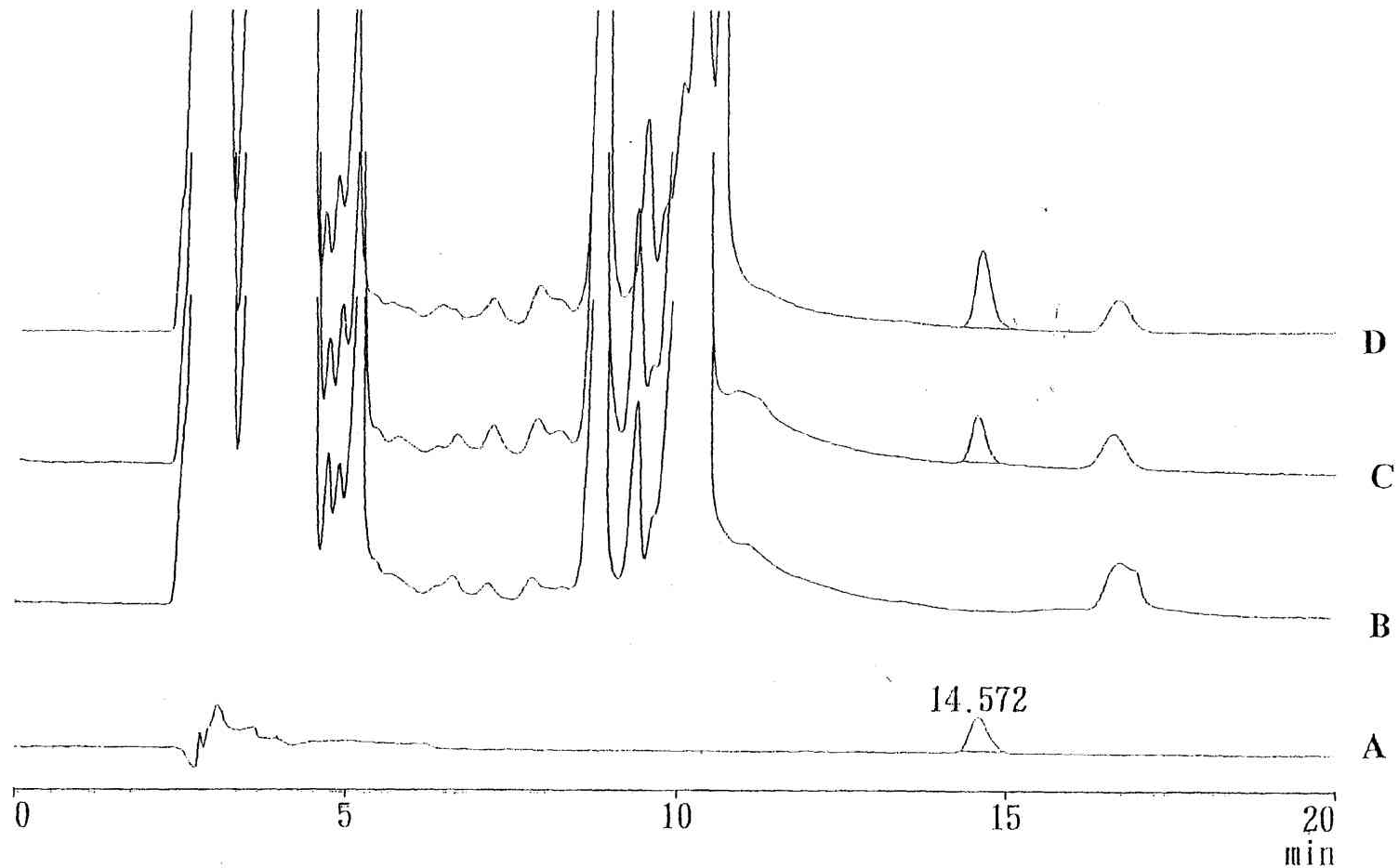


Fig. 6. Typical chromatograms (A-D) of the extract from the striatum after 50 μ M paraquat perfusion for 1 h followed by 3-h washing with Ringer's solution. A: authentic paraquat, B: the extract from contralateral striatum, C: the extract from ipsilateral striatum and D: the extract from ipsilateral striatum with authentic paraquat.

3. β -ラクタム系抗生物質ウィンセフの血液脳関門透過性と腎障害の影響に関する研究

セフォセリス (ウィンセフ) の血液脳関門透過性—腎不全の影響

Blood-brain barrier penetration of cefoselis in renal dysfunctional rats

大滝康一¹, 清水恵子², 山下恭範¹, 小川 聡¹, 上園 崇², 栗屋敏雄¹,
里見真知子¹, 千葉 薫¹, 早勢伸正¹, 塩野 寛², 松原和夫¹

1 旭川医科大学医学部附属病院薬剤部

2 旭川医科大学医学部法医学教室

Keywords : 硫酸セフォセリス, 血液脳関門, ブレインマイクロダイアリシス, 腎不全, β -ラクタム系抗生物質

cefoselis sulfate, blood-brain barrier, brainmicrodialysis, renal dysfunction, β -lactam antibiotics

緒言

広域なスペクトラムを有する新規の抗生物質が次々と開発されつつある。ショック症状以外重篤な副作用が認められなかったβ-ラクタム系抗生物質において、近年の新規の化合物においては、重大な副作用の一つとして痙攣や意識障害等の中枢神経障害が顕在化してきた。特に、硫酸セフォセリス(ウィンセフ)では、透析患者や腎不全患者において、中枢神経障害の発症例が、多く報告されている。このことは、新規開発のβ-ラクタム系抗生物質の中枢移行性に起因していると考えられる。しかし、β-ラクタム系抗生物質の血液脳関門透過性を評価した報告は少ない。そこで、β-ラクタム系抗生物質の血液脳関門透過性を、ブレインマイクロダイアリシス法を用いて評価を行った。更に、腎不全モデルラットを作成し、腎不全時のセフォセリスの血液脳関門透過性に与える影響について検討を行なった。

方法

Wistar系雄性ラット線条体にガイドカニューレを植え込み、3日以上経過後、膜長3mmのプロープを挿入し、Ringer's液を2 μ l/minの速度で灌流した。灌流開始4時間後に、硫酸セフォセリス(10, 50 and 400 mg/kg)を尾静脈より投与した。投与後、30分毎に灌流液を、1時間毎に尾静脈より血液を採取した。

腎不全モデルラットは、硝酸ウラニル(5mg/kg)を尾静脈より投与し、5日以上経過したものをを用いた。硫酸セフォセリスは、10および50 mg/kgを尾静脈より投与した。腎障害の評価は、血液尿素窒素およびクレアチニン値を測定することによって行った。

灌流液中のセフォセリスの濃度は、直接にHPLCに注入して測定した。また、血中のセフォセリスは、メタノールで除蛋白後分析を行った。

結果と考察

使用したプロープの透析膜を通したセフォセリスの透過率をインビトロで測定した。その結果、セフォセリスの透過率は、 $9.28 \pm 3.4\%$ であった。この値を用いて、脳細胞外液中のセフォセリス濃度を算定した。

セフォセリスは、用量依存的に投与後、速やかに灌流液中に検出され(Fig. 1)、その消失も速やかであった。脳細胞外液からの消失は、見掛け上一次の消失過程

であった。その消失速度は、血中からの消失速度と同じであった (Fig. 2)。

脳内細胞外液/血中濃度は 0.7-0.8 であり、セフォセリスの血液脳関門透過性は非常に高いと言える。

硝酸ウラニルによる腎不全モデルでは、血液尿素窒素が 194.8 ± 42.0 mg/dl (mean \pm SD) クレアチニンが 5.20 ± 2.24 mg/dl であった。一方、コントロールのラットでは、血液尿素窒素が 24.3 ± 9.3 mg/dl (mean \pm SD) クレアチニンが 0.5 mg/dl 以下であった。このラットを用いた実験では、血液中濃度、脳内細胞外液濃度ともに上昇した。これは、腎機能の低下に伴う、セフォセリスの血漿中濃度半減期の延長によるものであることが示唆された。

セフォリス 400 mg/kg という大量投与においても、脳からのセフォリスの消失は早く、3 時間後には $10 \mu\text{g/ml}$ 程度となる。しかし、高度の腎障害があると、10 mg/kg 投与でも脳細胞外液濃度は、 $10 \mu\text{g/ml}$ の濃度が長時間持続することになる。また、犬に 1000 mg/kg を投与しても、中枢障害は観察されていない。従って、重大な副作用である痙攣や意識障害等の中枢神経障害が顕在化するためには、ある一定の濃度が脳内で長時間持続することによると考えられる。

他の β -ラクタム系抗生物質についても脳内細胞外液/血中濃度を知ることは、副作用としての中枢障害を予測しうる指標となりえるものとする。

Extracellular concentration of cefoselis ($\mu\text{g/ml}$)

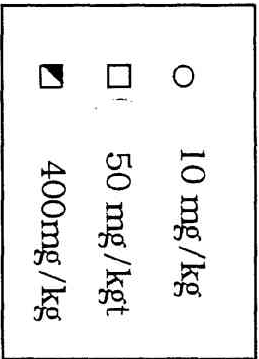
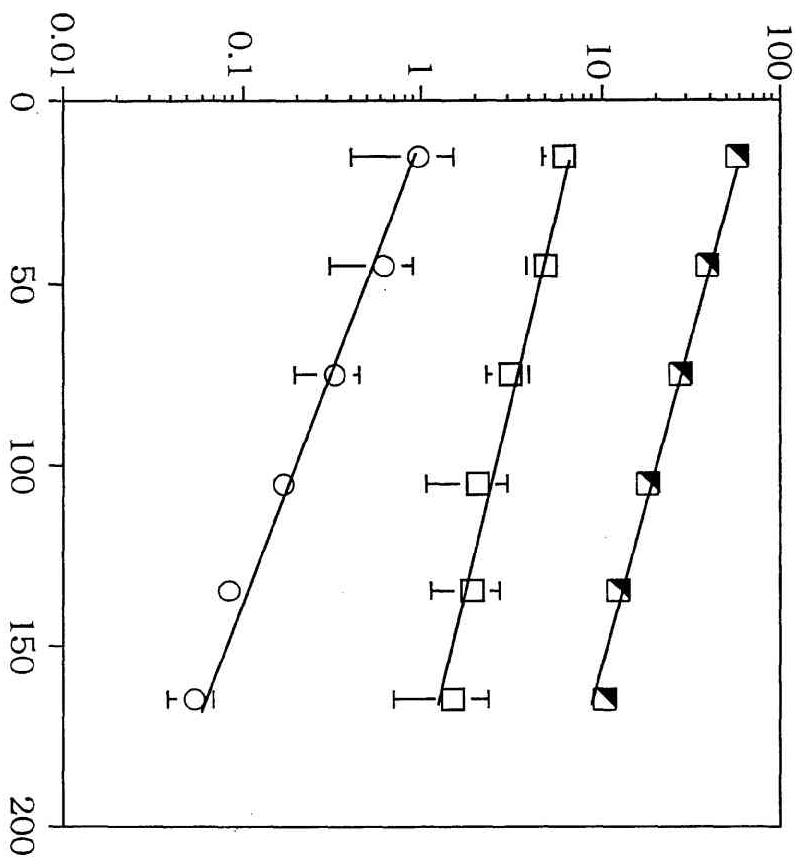


Fig. 1. Extracellular concentration of cefoselis in the striatum after an i.v. administration.

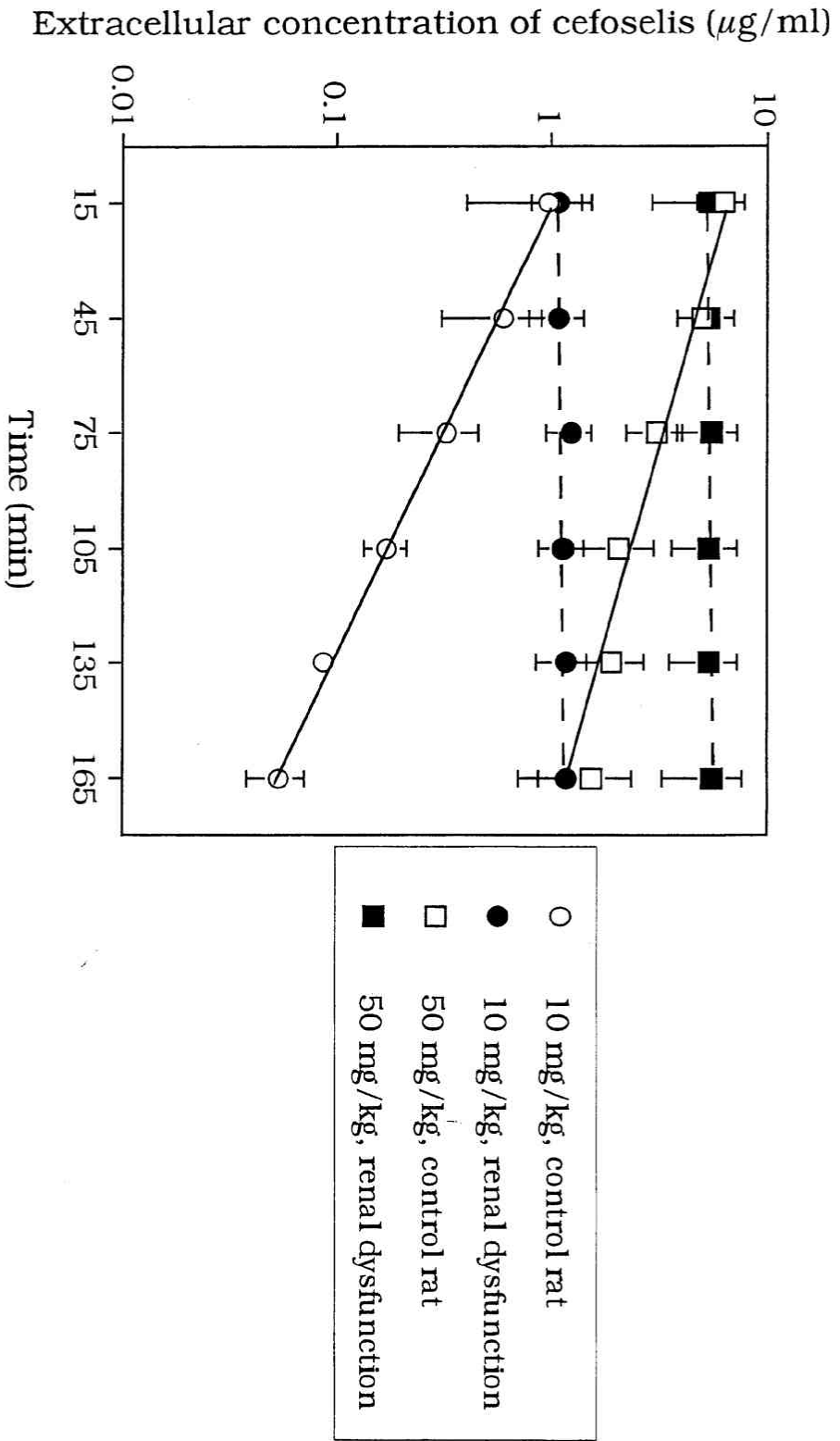


Fig. 2. Effect of renal dysfunction on the extracellular concentration of cefoselis in the striatum after an i.v. administration.

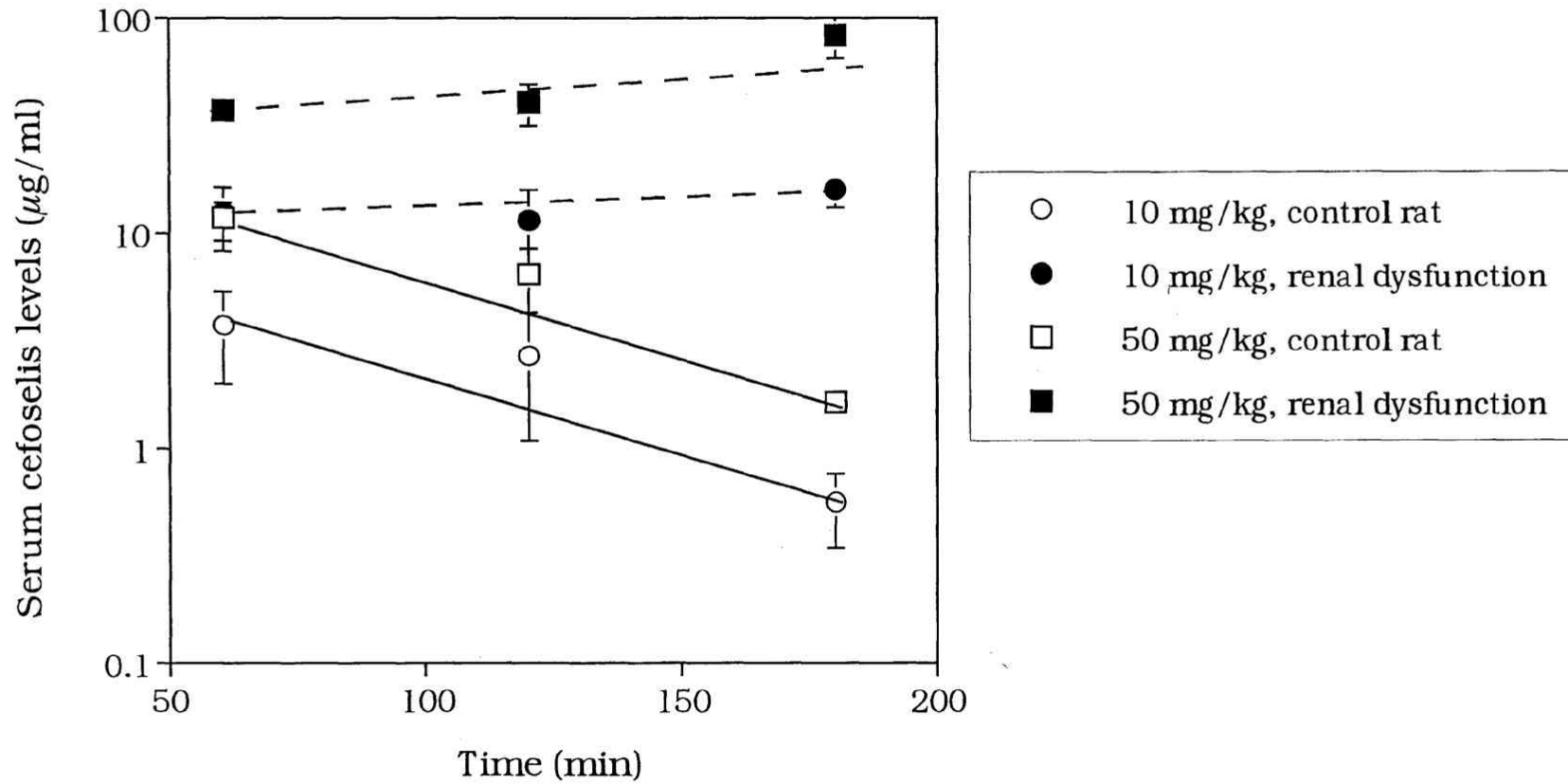


Fig. 3. Serum levels of cefoselis in normal and renal dysfunction rats after an i.v. administration.